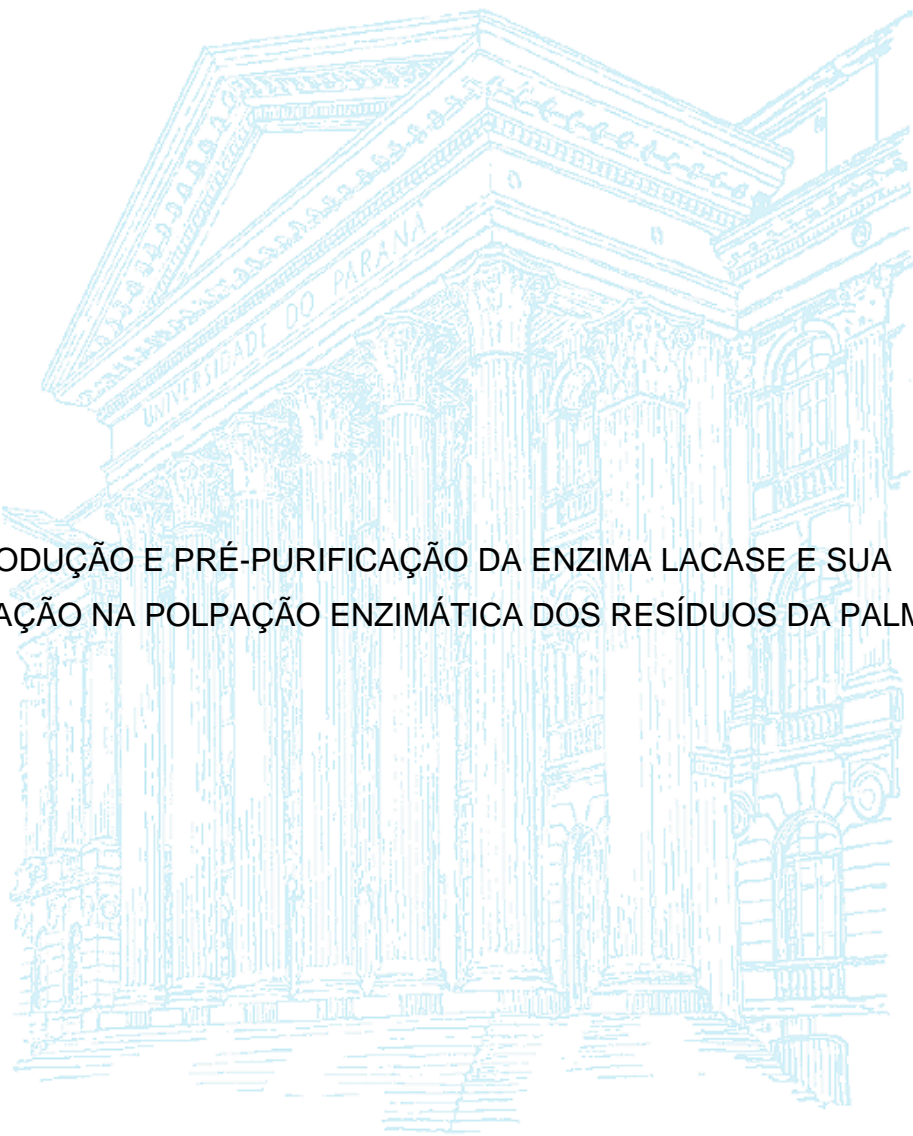


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZA RÉGNIER CHEMIM GUIMARÃES LORENCI



PRODUÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE E SUA
UTILIZAÇÃO NA POLPAÇÃO ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DA PALMA

CURITIBA

2016

LUIZA REGNIER CHEMIM GUIMARÃES LORENCI

PRODUÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE E SUA
UTILIZAÇÃO NA POLPAÇÃO ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DA PALMA

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Engenharia
de Bioprocessos e Biotecnologia, no Programa
de Pós-Graduação em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de
Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Adenise Lorenci
Woiciechowski

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

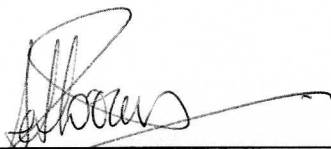
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

LUIZA REGNIER CHEMIM GUIMARÃES LORENCI

**"PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DA ENZIMA LACASE NO
PROCESSO DE POLPAÇÃO ENZIMÁTICA DOS CACHOS VAZIOS DA
PALMA OLEAGINOSA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski
Orientadora– Departamento de Eng^a de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR



Prof. Dra. Maria Giovana Binder Pagnoncelli
UTFPR



Prof. Dra. Susan Grace Karp
UP



Prof. Dr. Arion Zandoná Filho
UFPR

Curitiba, 28 de Abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski**, por todo o suporte, acompanhamento e orientação.

Ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do seu coordenador **Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol**, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos Professores **Dra. Susan Grace Karp** e **Dr. Arion Zandoná Filho** pelas contribuições e sugestões no trabalho.

Ao colega **Jesus David Coral Medina**, pela ajuda em diversos momentos da pesquisa.

À minha família pelo apoio recebido para conquistar este sonho, em especial meu marido **Gustavo Lorenci** por toda a confiança e paciência.

À CAPES pelo suporte financeiro para realizar as pesquisas.

RESUMO

Este trabalho compreendeu estudar e definir as condições de cultivo que otimizam a produção da enzima lacase por *Pleurotus* sp., que é um fungo da podridão branca utilizado nos processos de biopolpação. O estudo envolveu fermentações submersas com diferentes concentrações de fonte de carbono e nitrogênio e variações de pH. Testaram-se também diferentes indutores enzimáticos como o sulfato de cobre, ácido ferúlico, folhas e galhos de pinheiro moídos (PM) e cachos vazios da palma moídos (EFB). Com a escolha do melhor indutor enzimático definiu-se o tempo de fermentação para a produção de lacase através de uma cinética. As análises enzimáticas foram realizadas através de absorbância e o teor de açúcar consumido no processo através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a pré-purificação da enzima produzida foram feitas diversas filtrações, definindo assim a faixa de massa molar em que se encontra a molécula da enzima. Após a definição do melhor meio de fermentação, utilizou-se esta enzima para aplicação no EFB para a polpação enzimática, com objetivo de degradação da lignina, preservando a porção celulósica da fibra. Na fermentação realizada inicialmente a produção de lacase foi de 5,33 U/mL, e após os processos de otimização, escolha de indutores e cinética, a atividade enzimática apresentou valores elevados. Decidiu-se dar continuidade ao estudo utilizando o EFB como indutor já que o usodeste forneceu atividade enzimática de 110,01U/mL. Com este extrato enzimático de alta atividade aplicou-se a enzima no resíduo lignocelulósico da palma, o qual apresentou teores de lignina reduzidos preservando a porção celulósica do material.

Palavras-chave: Lacase, Produção enzimática, Polpação enzimática, Pinheiro, Palma

ABSTRACT

This study involved the search and definition of the culture conditions that optimized the production of the laccase enzyme by *Pleurotus* sp., which is a white rot fungus used in biopulping process. The study involved submerged fermentations with different source of carbon and nitrogen concentration and pH variation. Also tested different enzyme inducers such as copper sulfate, ferulic acid, milled leaves and branches of pine tree (PM) and milled palm empty bunches (EFB). With the definition of the best enzymatic inducer was determined the time of fermentation process by a kinetic. Enzymatic analyzes and the sugar content consumed in the process were carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC). For the pre-purification of the enzyme were realized several filtrations, thus defining the size of the enzyme molecule. After the definition of the best fermentation broth, this enzyme was used to apply in EFB for enzymatic pulping, in order to lignin degradation, preserving the cellulosic portion of the fiber. In the initial fermentation, laccase production was 5.33 U/mL, and after the process of optimization, choice of inducer and kinetic, the enzymatic activity showed high levels. It was decided to continue the study using the EFB as an inducer whereas that showed an enzymatic activity of 110.01U/mL. With this high activity of the enzymatic extract, the enzyme was applied in lignocellulosic waste palm, which reduced the lignin and preserved the cellulosic material.

Keywords: Laccase, Enzymatic production, Enzymatic pulping, Pine, Palm.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO ESTRUTURAL REPRESENTATIVO DA LIGNINA	15
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DE UMA LACASE DE <i>Trametes hirsuta</i> , MOSTRANDO OS ÍONS COBRE.....	19
FIGURA 3 - <i>Pleurotus sp.</i> CEPA PL09 REPICADA EM ÁGAR PDA.....	24
FIGURA 4 - CACHOS VAZIOS DA PALMA.....	32
FIGURA 5 - ANÁLISE ENZIMÁTICA DA LACASE EM MICROPLACA.....	33
FIGURA 6 - FILTRO AMICON ULTRA DE 100kDa.....	39
FIGURA 7 - ATIVIDADE DE LACASE NO 7° E 14° DIAS DE FERMENTAÇÃO PARA AS 10 AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
FIGURA 8 - GRÁFICO RELACIONANDO A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE NAS DIFERENTES AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL.....	45
FIGURA 9 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PM E ÁCIDO FERÚLICO COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.	47
FIGURA 10 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PM E PALMA COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.....	48
FIGURA 11 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PALMA E COBRE COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.....	48

FIGURA 12 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PALMA E ÁCIDO FERÚLICO COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE.....	49
FIGURA 13 - GRÁFICO DE PARETO COM AS VARIÁVEIS PALMA, ÁCIDO FERÚLICO, SULFATO DE COBRE E PM.....	50
FIGURA 14 - GRÁFICO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONSUMO DE GLICOSE DURANTE 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO.....	52
FIGURA 15 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE NAS DIFERENTES AMOSTRAS DA PRÉ-PURIFICAÇÃO.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FUNGOS PRODUTORES DA ENZIMA LACASE E SEUS SUBSTRATOS.....	21
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÕES DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DOS INDUTORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO ROTACIONAL FATORIAL.....	37
TABELA 4 - AMOSTRAS DO PROCESSO DE PRÉ-PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE E SEUS TIPOS DE PROCESSAMENTO.....	38
TABELA 5 - ATIVIDADE DA LACASE PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO A CEPA PL09.....	42
TABELA 6 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA LACASE, EM U/mL PARA 7 E 14 DIAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	43
TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DOS INDUTORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO ROTACIONAL FATORIAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.....	46
TABELA 8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONSUMO DE GLICOSE DURANTE 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO.....	51
TABELA 9 - RELAÇÃO DOS DIFERENTES FILTRADOS E SUAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	53
TABELA 10 - TEOR DE LIGNINA, CELULOSE E HEMICELULOSE DURANTE A POLPAÇÃO ENZIMÁTICA.....	54

LISTA DE SIGLAS

ABTS	-	2,2'-azino-bis- [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]
BDA	-	Batata dextrose Ágar
CuSO ₄	-	Sulfato de cobre
d	-	Dias
EFB	-	Empty Fruit Bunches (Cachos vazios da palma moídos)
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PM	-	Folhas e galhos de pinheiro moído
RPM	-	Rotações por minuto
T1	-	Centro de cobre tipo 1 na enzima lacase
T2	-	Centro de cobre tipo 2 na enzima lacase
T3	-	Centro de cobre tipo 3 na enzima lacase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 LIGNINA E RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.....	15
2.2 POLPAÇÃO.....	16
2.2.1 Biopolpação.....	16
2.2.2 Polpação Enzimática.....	17
2.3 LACASES.....	18
2.3.1 Fontes de lacases.....	20
2.4 GÊNERO Pleurotus.....	23
2.5 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE LACASE.....	24
2.6 SUBSTÂNCIAS INDUTORAS.....	25
2.6.1 Pinheiro.....	26
2.6.2 Palma.....	26
2.6.3 Cobre.....	27
2.6.4 Ácido Ferúlico.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 CULTIVO E INOCULAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	20
4.2 PREPARO DE INDUTORES.....	31
4.2.1 Pinheiro.....	31
4.2.2 Palma.....	31
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	32
4.3.1 Lacase.....	32
4.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	33
4.5 OTIMIZAÇÃO DO MEIO.....	34
4.5.1 Teste base.....	34
4.5.2 Planejamento fatorial para otimização da composição do meio de fermentação.....	35

4.6 ESCOLHA DOS INDUTORES.....	36
4.7 CINÉTICA.....	37
4.8 PRÉ PURIFICAÇÃO/CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO....	38
4.9 POLPAÇÃO ENZIMÁTICA.....	40
4.9.1 Análise do substrato lignocelulósico.....	40
5 ANÁLISE DE RESULTADOS.....	41
5.1 TESTE BASE.....	41
5.2 OTIMIZAÇÃO DO MEIO.....	42
5.3 ESCOLHA DOS INDUTORES.....	44
5.4 CINÉTICA.....	50
5.5 PRÉ PURIFICAÇÃO.....	52
5.6 POLPAÇÃO ENZIMÁTICA.....	53
6 CONCLUSÃO.....	55
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A polpação é um processo de tratamento de materiais lignocelulósicos desenvolvido para ser aplicado em escala industrial para a produção de papel e celulose. Atualmente, o processo mais empregado e difundido é a polpação química que degrada a hemicelulose, amolece e solubiliza a lignina da biomassa vegetal e recupera a pasta de celulose em condições químicas agressivas e em temperaturas altas (MENDONÇA et al., 2002). Dentre os processos de polpação, a biopolpação e a polpação enzimática estão sendo estudadas e propostas como alternativa que demandam menos energia e utilizam condições muito menos severas, em comparação à polpação química e mecânica (FERRAZ, 2007; FONSECA et al., 2014).

A polpação enzimática é um método direto de polpação, no qual aplica-se a enzima ao material de interesse a ser tratado (MARTÍN-SAMPEDRO et al., 2012). Com esta aplicação direta reduz-se o tempo de polpação, melhorando custos do processo (em comparação à biopolpação, na qual ocorre a aplicação do fungo ao material, produção da enzima “*in situ*” demandando mais tempo para a degradação da lignina, pois necessita primeiramente que haja o crescimento do microrganismo) (FERRAZ, 2007; FONSECA et al., 2014).

Uma das enzimas mais utilizadas neste tipo de pré-tratamento é a lacase, que tem capacidade de degradar a lignina e compostos com similaridade estrutural com a lignina (ALVES, 2011). Os maiores produtores destas enzimas são os fungos da podridão branca, os basidiomicetos, dentre eles destaca-se o gênero *Pleurotus* (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013); e também os da podridão parda.

Os processos biotecnológicos envolvendo a aplicação de enzimas necessitam que sejam obtidas enzimas com alta atividade para serem eficazes, e normalmente as enzimas são produzidas em pequena quantidade. Diversos indutores enzimáticos vêm sendo estudados e utilizados para melhorar a produção da lacase. Estes indutores podem ser o substrato ou análogos do substrato da enzima, no caso da lacase, compostos aromáticos são utilizados como indutores (ALVES, 2011).

Uma forma de melhorar os custos na produção enzimática é a utilização de substratos naturais (como alguns resíduos agrícolas lignocelulósicos) como indutores. Além da redução de custos e aumento na produção, aumenta também o valor agregado do produto com o aproveitamento de seus resíduos (ALVES, 2011).

É possível que biomassas como as folhas e galhos de Araucária, o qual contém grupos fenólicos em sua composição (CORDENUNSI *et al*, 2004), possuam potencial para a indução de produção de lacases. Assim como resíduos lignocelulósicos industriais como por exemplo a palma oleaginosa.

Além do seu possível uso como indutor enzimático, o resíduo do processamento da palma é um material lignocelulósico com alto potencial de uso e produzido em grande quantidade no processo de obtenção do óleo de palma. Este resíduo pode passar por um processo de pré-tratamento (polpação enzimática) reduzindo os teores de lignina e hemicelulose para melhorar a acessibilidade e digestibilidade da celulose. Pode-se assim aproveitar a celulose na indústria papeleira (KIM *et al.*, 2012) ou na sacarificação para a produção de glicose para uso como substrato em processos biotecnológicos.

Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo otimizar a produção enzimática de lacase com o fungo *Pleurotus* sp., utilizando como indutores substratos naturais. Também, aplicar esta enzima nos resíduos lignocelulósicos da palma para realizar a biopolpação e preservar a celulose para um futuro uso.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LIGNINA

A lignina é o segundo material natural mais abundante depois da celulose, é encontrada nos vegetais. É uma molécula biodegradável, tridimensional, altamente ramificada e não cristalina (RAMIRES, 2010).

O papel da lignina nos vegetais é dar rigidez à parede celular, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos da planta. Devido à sua estrutura química é a mais resistente à decomposição biológica, se comparada com os outros biopolímeros (CARVALHO et al., 2010). O teor de lignina nas espécies vegetais pode variar, em madeiras coníferas seu valor fica em torno de 30%, já em madeiras de folhosas varia entre 15 e 24% (ALESSIO et al., 2008).

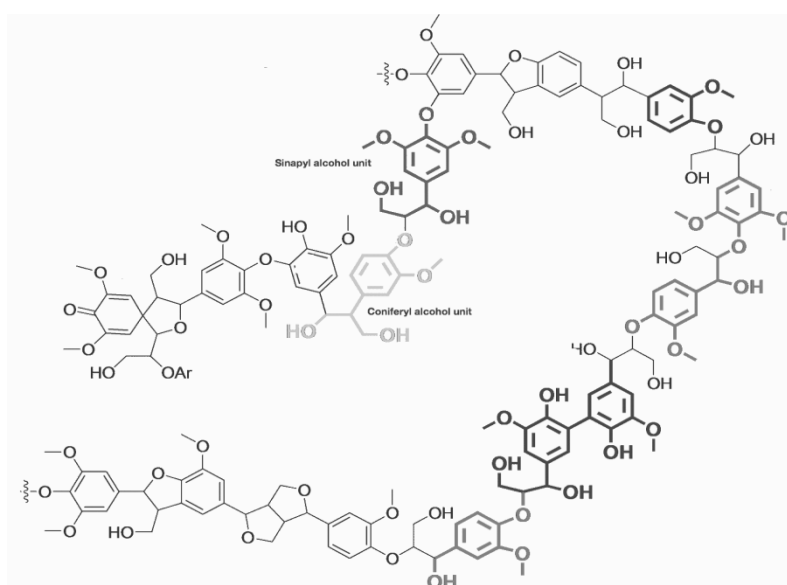


FIGURA 1 - MODELO ESTRUTURAL REPRESENTATIVO DA LIGNINA
FONTE: O AUTOR (2016)

Sua estrutura é composta por grupos aromáticos alifáticos, com anéis fenilpropânicos substituídos, unidos por diferentes tipos de ligação, como ligações carbono-carbono ou éter, observadas na figura 1. As principais

unidades que ocorrem na lignina são: guaiacila, siringila e para-hidroxifenila. Cada espécie vegetal produz uma lignina rica em algum tipo destas unidades, o que faz com que a estrutura específica da lignina varie (RAMIRES, 2010).

O Brasil produziu em 2014 13.977mil toneladas de celulose e 10.260 mil toneladas de papel, é o quarto maior produtor mundial de celulose e o nono maior produtor de papel. O país cresceu em relação à produção de celulose e papel do ano anterior, com um aumento de 7,1% na produção de celulose e 5,4% em papel. Segundo os últimos dados obtidos no setor com relação à exportação, em 2011 o Brasil exportou US\$ 2.8 milhões (BRACELPA, 2014).

2.2 POLPAÇÃO

2.2.1 Biopolpação

A biopolpação é o pré-tratamento que promove a deslignificação de materiais lignocelulósicos através de enzimas ligninolíticas produzidas *in situ* (usualmente utilizando fungos) em um processo de fermentação em estado sólido, no qual os fungos secretam um *pool* de exoenzimas para o meio sólido. Estas enzimas atuam sobre o substrato sólido degradando as ligações químicas da molécula de lignina, fazendo com que o material se desestabilize (MENDONÇA et al., 2002).

Este é um processo controlado e os fungos devem ser selecionados devido às suas atividades enzimáticas. Devem apresentar uma atividade elevada de lacases e peroxidases, e atividade de celulase baixa para preservar a fração celulósica e digerir apenas a lignina da célula vegetal. Neste processo a lacase é uma das enzimas mais importantes (MENDONÇA et al., 2002).

O processo de biopolpação foi inicialmente desenvolvido para ser aplicado na indústria de papel e celulose, na qual o principal desafio é a remoção da lignina da biomassa vegetal e a recuperação da pasta de celulose.

Vários estudos demonstram a relação positiva entre os efeitos da

biopolpação e a intensa despolimerização da lignina (MENDONÇA et al., 2002), sendo a principal mudança estrutural a quebra das ligações beta-4-O, reduzindo a massa molar de lignina (GUERRA et al., 2003). Também pode ser citado o aumento dos grupos terminais carboxilas da estrutura da madeira e a esterificação do oxalato devido ao metabolismo dos fungos durante o processo de biopolpação (FERRAZ, 2007; FONSECA et al., 2014).

Em resumo, o objetivo da biopolpação é a produção da pasta celulósica demandando menos energia através de um processo menos severo (em comparação à polpação química e mecânica convencionais), para promover a desfibrilação do material, melhorando a resistência e a qualidade da fibra de papel, e produzindo um melhor rendimento na recuperação de celulose (FERRAZ, 2007; FONSECA et al., 2014).

2.2.2 Polpação Enzimática

A polpação enzimática é um método de pré-tratamento que envolve a aplicação direta das enzimas de interesse no material a ser tratado. Este tipo de tratamento foi desenvolvido como uma alternativa aos pré-tratamentos biológicos, que utilizam a aplicação direta de fungos ao material a ser tratado o que faz com que este processo seja mais lento devido ao tempo de crescimento dos fungos e à dificuldade em manter o processo asséptico durante um longo período (MARTÍN-SAMPEDRO et al., 2012).

Além de substituir os pré-tratamentos com aplicação de fungos, a polpação enzimática pode também ser uma boa alternativa para substituir os catalisadores químicos da polpação termoquímica tradicional, já que promove a digestão em condições mais suaves. No caso das enzimas lacases, a aplicação direta é muito utilizada para a degradação da lignina de materiais lignocelulósicos, sem necessidade de obter primeiramente o crescimento do fungo, reduzindo o tempo de processo. O crescimento dos microrganismos para a produção das enzimas é realizado em reatores sob condições controladas e ótimas (HYEON et al., 2014).

2.3 LACASES

As enzimas lacases são umas das poucas enzimas que vêm sendo estudadas desde o século XIX. Foram descritas pela primeira vez em 1883 por Yoshida, que extraiu as enzimas de um exudato da árvore de *Rhus vernicifera*, uma árvore de laca japonesa. Apenas 13 anos após sua primeira descrição, Bertrand e Laborde consideraram as lacases como enzimas produzidas por fungos (VISWANATH et al., 2014).

As lacases pertencem ao grupo das oxidases azuis de cobre, denominadas multicobre oxidases azuis, que catalisam a oxidação de fenóis, aminas aromáticas, e outros compostos aromáticos, fazendo a redução do oxigênio molecular à água. As lacases contêm dois centros de cobre que são responsáveis por fazer a transferência de elétrons durante as reações redox (FAN et al., 2014). Um dos centros é mononuclear e possui o cobre tipo 1 (T1), já o outro centro é tri-nuclear e possui um cobre do tipo 2 (T2) e dois do tipo 3 (T3), que podem ser melhor visualizados na figura 2 (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015).

O cobre T1 é responsável pela coloração azul das enzimas associado com a banda de absorção em torno de 600nm (FAN et al., 2014) e perto dele ocorrem as oxidações dos substratos. A partir destas oxidações ocorrem a transferência de elétrons para o centro tri-nuclear, no qual ocorre a redução de dioxigênio para moléculas de água (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015).

O cobre T2 atua na atividade catalítica e redox, em conjunto com três moléculas de histidinas. Já o cobre T3 faz a ativação do O₂ para transporte e oxigenação, também em conjunto com três histidinas (MESSERSCHMIDT, 1990; GIL et al., 2009).

Estudos sugerem que lacases produzidas por espécies diferentes possuem diferentes características catalíticas, mesmo que este local catalítico tenha sido conservado evolutivamente. A molécula pode apresentar variabilidade tanto na sua estrutura protéica quanto nos glicídios (ALVES, 2011).



FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DE UMA LACASE DE *Trametes hirsuta*, MOSTRANDO OS ÍONS COBRE (POLYAKOV, N.D.; THE JMOL TEAM, 2007).
FONTE: O AUTOR

As propriedades da lacase como a massa molecular, pH, especificidade de substrato, temperatura ótima, entre outras, podem variar dependendo da fonte, do procedimento de isolamento e purificação. A maioria das lacases apresenta uma massa molecular entre 50 e 130kDa (ALVES, 2011).

A ação das lacases e sua atividade são induzidas por substratos que apresentam ligações específicas e similaridade estrutural com a lignina, que é um polímero polifenólico amorfo e ocorre naturalmente na natureza como componente natural da célula vegetal. Além disso as lacases podem atuar sobre diversos compostos químicos, de estrutura semelhante à lignina, como corantes (utilizados em processos industriais), pesticidas, herbicidas e produtos agrícolas, que precisam ser degradados antes de serem descartados para preservar o meio ambiente (ALVES, 2011). Ou seja, estas enzimas possuem ampla gama de aplicações em diferentes áreas da biotecnologia, como na área alimentar, têxtil, de papel, de corantes, tratamento de efluentes, na área farmacêutica, em biossensores e imunoquímica (ARORA; SHARMA, 2010).

2.3.1 Fontes das lacases

As lacases são encontradas em muitas espécies de plantas, insetos e microrganismos; mas a maioria das lacases são isoladas a partir de fungos superiores (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Nas fontes naturais as lacases são relatadas em plantas e insetos; Karla et al. (2013) relatam a presença da lacase em plantas como a laca, sementes de milho, manga, feijão verde, pêssago e pinho; já Arora et al. (2010) relatam em ameixa seca e sycamore. Karla et al. (2013) também relatam a ocorrência de lacases em insetos como Bombyx e Calliphora, e Arora et al. (2010) encontraram em Drosophila, Lucilia, Manduca, Musca, Oryctes, Papilio, Phormia, Rhodnius, Sarcophaga, Schistocerca e Tenebrio. Os valores de atividades de lacase nestas fontes não foram relatados, mas em geral nas fontes naturais as atividades são muito baixas (ARORA; SHARMA, 2010; KALRA et al., 2013)

Em microrganismos, encontra-se esta enzima em bactérias e fungos. As bactérias não são tão estudadas e usadas quanto os fungos, mas a primeira bactéria na qual se descobriu a presença de lacase foi o *Azospirillum lipoferum*, e estas enzimas foram relatadas em outras espécies como *Bacillus subtilis*, *Bordetella campestris*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*, segundo Karla et al. (2013), e em *Pseudomonas aeruginosa*, *Azospirillum lipoferum*, *Caulobacter crescentus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, segundo Arora et al. (2010) (ARORA; SHARMA, 2010; KALRA et al., 2013).

Quanto aos fungos, os produtores mais comuns e eficientes são os fungos da decomposição da madeira, chamados de fungos da podridão branca e da podridão parda, durante seu metabolismo secundário (FARIA, 2010; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Os gêneros *Trametes* e *Pleurotus* são os mais estudados (CABANA et al., 2007). A atividade de lacase foi observada em diversas estirpes de fungos (tabela 1) e esta enzima foi purificada a partir de muitas espécies.

TABELA 1 - FUNGOS PRODUTORES DA ENZIMA LACASE E SEUS SUBSTRATOS

FUNGOS PRODUTORES	ATIVIDADE DE LACASE	SUBSTRATO	REFERÊNCIA
<i>Coriolopsis polyzona</i>	148 U/g	Glucose suplementada com extrato de levedura	(CABANA et al., 2007)
<i>Coriolopsis rigida</i>	3x10 ⁵ nkat/L 16000 nkat/L	Farelo de cevada Casca de castanha	(GÓMEZ et al., 2005)
<i>Grifola frondosa</i>		Caldo batata dextrose, extrato de levedura, sulfato de cobre e 2,5-xilidina	(NITHERANONT et al., 2011)
<i>Lentinula edodes</i>	22,2U/mL	Casca de café	(SILVA et al., 2012)
<i>Phlebia rufa</i>	2,59U/mL	Trigo	(ALVES, 2011)
<i>Pleurotus florida</i>	3,8U/mL	Casca de café	(SILVA et al., 2012)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	56,0U/g	Resíduo de laranja	(ALEXANDRINO et al., 2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	22,5U/mL	Casca de café	(SILVA et al., 2012)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	180U/mL	Espiga de milho	(TYCHANOWICZ et al., 2004)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	16U/L	Bagaço de cana	(KAMIDA et al., 2005)
<i>Pleurotus</i> sp.	3,52U/L	Bagaço de cana	(MENEZES et al., 2009)
<i>Pleurotus tailandia</i>	1,63U/L	Bagaço de cana	(MENEZES et al., 2009)
<i>Trametes hirsuta</i>	929,90 nkat/L	Polpa de coco	(COUTO; HERRERA, 2006)
<i>Trametes versicolor</i>	5500U/L	Meio MDT suplementado com uma mistura fenólica (Procion Orange MX-2R, Remazol Red 3B, Remazol Black GF)	(TAVARES, 2006)

Os basidiomicetos são fungos da podridão branca que sintetizam enzimas exocelulares capazes de degradar a lignina, uma delas é a lacase, outras são a lignina peroxidase e manganês peroxidase (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009). A lacase também aparece em fungos saprofíticos como os ascomicetos (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

As maiores quantidades de lacases são produzidas na natureza por fungos da podridão branca, microrganismos que são principalmente responsáveis pela decomposição da lignina. As lacases fúngicas são secretadas para o meio pelo micélio (COUTO E HERRERA, 2006), em múltiplas isoformas, dependendo da espécie de fungo e das condições ambientais. Esta variedade de ocorrência está relacionada com a diversidade das suas funções: degradação/síntese de lignina, desenvolvimento de corpos de frutificação, produção de pigmentos, desintoxicação de células (PISCITELLI; VECCHIO, DEL; et al., 2011). A diversidade bioquímica das isoenzimas lacases ocorre pela multiplicidade de genes de lacases e sua regulação da expressão pode ser substancialmente diferente entre espécies de fungos (KOROLEVA et al., 2002).

A fermentação em estado sólido é um modo operacional interessante para a produção de lacases porque imita o ambiente natural do fungo da podridão branca, no entanto, bons resultados foram obtidos também em fermentação submersa. Exemplos de microrganismos que foram encontrados para produzir lacase com atividade elevada em fermentação submersa são: *Trametes pubescens* (740 U/L) (GALHAUP et al., 2002), *Coriolus hirsutus* (83,83 U/L) (KOROLEVA et al., 2002), *Trametes hirsuta* (19,40 U/L) (RODRÍGUEZ COUTO et al., 2006), *Trametes versicolor* (16 U/L) (FONT et al., 2003), *Pycnoporus cinnabarinus* (10 U/L) (MEZA et al., 2007), *Neurospora crassa* (10 U/L) (LUKE; BURTON, 2001) e *Pleurotus ostreatus* (3,50 U/L) (LENZ; HÖLKER, 2004).

Considerando a produtividade, alguns resultados relatados são: 80 U/mL após 12 dias em cultura líquida de *Pleurotus ostreatus* sem indutores exógenos (LETTERA et al., 2011); 12,2 U/mL após 18 dias por *Pleurotus ostreatus* (TLECUITL-BERISTAIN et al., 2008). Outros valores de produtividade de lacases em fermentação em estado sólido relatados na literatura são: 151,6 U/g de bagaço de cana após 5 dias (KARP et al., 2012); 90 U/g de bagaço de

cana produzido por *Pycnoporus cinnabarinus* após 14 dias de fermentação em estado sólido em colunas, e atividades de 80 U/g após 6 dias (MEZA et al., 2005); 70 U/g de bagaço de cana, produzido por *Pycnoporus cinnabarinus* após 10 dias (MEZA et al., 2006).

2.4 GÊNERO *Pleurotus*

Os fungos do gênero *Pleurotus* pertencem à ordem Agaricales e à família Agaricaceae (BERNARDI; NASCIMENTO, 2011), são estudados no mundo todo devido ao valor gastronômico do seu corpo de frutificação, habilidade de colonizar e degradar uma vasta variedade de resíduos lignocelulósicos. Muito comuns nas florestas brasileiras, geralmente são encontrados em troncos de árvores debilitadas ou mortas (CAMPOS et al., 2010).

De acordo com a espécie e incidência de luz durante a frutificação estes fungos apresentam diversas colorações como branco, azul claro, marrom e rosa [46]. Eles têm a vantagem de crescer em uma faixa de temperatura muito grande, variando de 15 até 31°C (CAMPOS et al., 2010), e são de fácil cultivo, por se desenvolverem em diversas matérias-primas (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007).

São conhecidos como fungos da podridão branca da madeira, pela sua capacidade de se desenvolver nos materiais que possuem celulose, hemicelulose e lignina (FIGUEIRÓ; GRACIOLLI, 2011). Têm capacidade de produzir diversas enzimas lignocelulósicas como a celulase, hemicelulase, ligninase, celobiase e lacase; o que possibilita que estes fungos degradem uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos (RAMPINELLI et al., 2010). Normalmente se comportam como fungos seletivos, degradando primeiramente a lignina, mantendo quase que intacta a porção celulolítica do material.



FIGURA 3 -*Pleurotus* sp. CEPA PL09 REPICADA EM ÁGAR PDA
FONTE: O AUTOR

Vários são os resíduos industriais utilizados no cultivo destes fungos como a palha de soja, palha de aveia, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, palha de arroz, polpa e casca de frutas, gramíneas, forragens, serragens, entre outros (BERNARDI; NASCIMENTO, 2011).

Além da aplicação lignolítica eles são capazes de biodegradar diversos poluentes tóxicos e recalcitrantes, o que gera um grande interesse acadêmico e industrial (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007).

2.5 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE LACASE

A produção e atividade das lacases são diretamente influenciados por alguns parâmetros como o substrato a ser utilizado, a técnica de fermentação, a agitação, a aeração, o tempo de cultivo, entre outros. A produção desta enzima está ligada a uma regulação complexa de nutrientes que afetam diretamente a expressão das lacases, que são: fontes de carbono e nitrogênio, suas respectivas concentrações e a relação entre eles (relação C/N), também os tipos de indutores utilizados e suas concentrações (VALLE, 2012).

Os fungos da podridão branca podem produzir grandes quantidades da enzima lacase se suas condições de cultivo e concentrações do meio estiverem adequadas. Para que isto aconteça, é necessário otimizar o meio de cultivo. Na otimização dos meios levam-se em conta diversos parâmetros como a fonte e a concentração de carbono, e nitrogênio, fosfato, minerais, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença/ausência de indutores, pH, temperatura, agitação, tempo de incubação, tipo de cultivo e estirpe, manipulação genética (ALVES, 2011).

Os valores de pH e de temperatura são os mais estudados e observados em trabalhos anteriores, e diversos autores chegaram à conclusão que um pH ideal para produção desta enzima seria em torno de 4,0 a 6,0; e a temperatura ótima entre 25 e 30°C (ALVES, 2011).

2.6 SUBSTÂNCIAS INDUTORAS

As aplicações biotecnológicas necessitam de uma grande produção da enzima e de alta atividade enzimática, mas normalmente estas enzimas são produzidas em pequenas quantidades; para isto vêm sendo utilizados diversos indutores para melhorar a produção da lacase. Indutores enzimáticos podem ser o substrato ou análogos do substrato da enzima, no caso da lacase, compostos aromáticos são utilizados como indutores. Eles servem para aumentar a produção da enzima nos meios de cultura (ALVES, 2011).

Uma forma de reduzir custos no processo de produção enzimática é utilizar como indutores substratos naturais como alguns resíduos agrícolas lignocelulósicos. Além da redução de custos e aumento na produção, aumenta também o valor agregado do produto com o aproveitamento dos seus resíduos (ALVES, 2011). Já foram relatados alguns indutores como: farelo e palha de trigo, farelo de cevada, palha de aveia, palha de arroz, bagaço de cana, polpa e licor de batata, sumo de tomate, casca de banana, casca de tangerina, resíduos de laranja e kiwis, águas residuais de destilarias de vinho e resíduos da indústria cervejeira (BERNARDI; NASCIMENTO, 2011).

2.6.1 Pinheiro

A *Araucaria angustifolia* (Araucária) é encontrada em altitudes que variam de 500 a 1500 metros e desenvolve-se em regiões de clima temperado. No Brasil, desenvolve-se desde a Mantiqueira ao Rio Grande do Sul, nos mais variados solos (MERLIM, 2005), mas sua principal concentração ocorre nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É conhecida como pinheiro do Paraná, pinheiro brasileiro, pinho, pinho do Paraná, pinheiro ou araucária (MERLIM, 2005).

Como as lacases catalisam reações cujos substratos possuem compostos fenólicos, é possível que materiais como as folhas e galhos de Araucária moídos (PM), os quais contêm grupos fenólicos em sua composição (CORDENUNSI et al., 2004), possuam potencial para a indução de produção de lacases.

2.6.2 Palma

A palma (*Elaeis guineensis*) é uma planta nativa da costa ocidental da África trazida ao Brasil no século XVI. É conhecida no Brasil como dendezeiro ou palma africana. Sua importância deve-se tanto ao óleo extraído de seus frutos (conhecido como azeite de dendê) quanto à produção de bioetanol (RIBEIRO et al., 2010).

É uma cultura agrícola dominante em muitos países, e a Malásia e Indonésia são os seus maiores produtores. Na América do Sul o Brasil é o terceiro maior produtor, depois de Colômbia e Equador, produzindo 340 milhões de toneladas, representando 0,58% da produção mundial de óleo de palma (CORAL MEDINA et al., 2015).

As indústrias de óleo de palma na Indonésia e Malásia geram cerca de 55,73 milhões de toneladas de resíduos agrícolas lignocelulósicos e subprodutos por ano. Um abundante sub-produto da indústria de óleo de palma é o cacho vazio da fruta, que possui em sua composição em torno de 41,3 a 46,5%

de celulose, 25,3 a 33,8% de hemicelulose e 27,6 a 32,5% de lignina (KIM et al., 2012).

Estes cachos vazios são utilizados como fonte de calor e eletricidade em incineração nas fábricas de óleo de palma, causando poluição ambiental (CORAL MEDINA et al., 2015).

Este resíduo é um material lignocelulósico com alto potencial de uso, em processos biotecnológicos mas necessita de um processo de pré-tratamento para melhorar a acessibilidade e digestibilidade de celulose, reduzindo teores de lignina e hemicelulose. Os pré-tratamentos mais estudados atualmente são os tratamentos alcalinos e ácidos, combinados com alta temperatura ou pressão elevada (KIM et al., 2012).

2.6.3 Cobre

O cobre é um componente essencial para a lacase, e seu uso como indutor aumenta a produção desta enzima em diversas espécies de fungos. O efeito do indutor pode variar conforme os gêneros dos fungos (ALVES, 2011).

Ele induz a transcrição de lacase, aumentando sua atividade induzindo o estresse oxidativo no cultivo (NETO, 2012). A utilização do cobre como indutor tem apresentado resultados satisfatórios, como relatado por Iyer e Chattoo, (2003), que obtiveram a atividade da lacase aumentada em oito vezes pela adição de 0,4 mmol/L de CuSO_4 (GARCIA, 2006).

2.6.4 Ácido Ferúlico

São muitos os compostos fenólicos utilizados para induzir a produção de lacase, dentre eles o ácido ferúlico é relatado por ser eficaz em diversas culturas (MANAVALAN et al., 2013). Algumas espécies de fungos nas quais o ácido ferúlico é utilizado como indutor da lacase são: *Volvariella volvacea*, *Pleurotus radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pycnoporus*

cinnabarinus, *Trametes versicolor*, *Pholiota mutabilis*, *Cladosporium cladosporioidesi*, entre outros (ALVES, 2011).

Em um estudo realizado por PISCITELLI et al. (2011) o ácido ferúlico e a vanilina, utilizados como indutores de lacase, foram os maiores produtores da enzima; neste estudo foram utilizados como indutores 15 diferentes compostos fenólicos. Além de aumentar a produção de lacase, também induziu a expressão de uma isoenzima da lacase que era indetectável em condições normais (PISCITELLI et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção da enzima lacase e realizar a biopolpação enzimática no resíduo industrial de palma através da aplicação da enzima lacase produzida pelo microrganismo *Pleurotus* sp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção e a atividade da enzima lacase.
- Testar e selecionar o melhor indutor enzimático.
- Estudar a cinética do processo.
- Otimizar o tempo de fermentação para a produção das lacases.
- Realizar a pré-purificação/concentração do extrato enzimático.
- Realizar a biopolpação enzimática nos resíduos da palma.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Processos Biotecnológicos II (LPBII) do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1 CULTIVO E INOCULAÇÃO DO MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado durante todo o estudo foi o fungo *Pleurotus* sp. (cepa PL09) fornecido pelo banco de culturas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A seleção desta cepa foi feita baseada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná (dados não mostrados).

Para o cultivo do microrganismo PL09 utilizou-se o meio Batata Dextrose Agar (BDA) previamente autoclavado a 120°C por 20 minutos. Os meios inoculados foram incubados em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 30°C por 15 dias (total colonização do meio) e posteriormente armazenamento em refrigeração a 4°C.

Para a inoculação no meio de fermentação, foram retirados do meio sólido (armazenado em geladeira) oito discos de tamanho aproximado de 7mm de diâmetro (tamanho padronizado para todos os experimentos). Estes discos foram transferidos para os meios de fermentação sob condições assépticas.

4.2 PREPARO DE INDUTORES

4.2.1 Pinheiro

Foram coletadas folhas e galhos de Araucária na região de Curitiba no estado do Paraná, os quais foram trazidos para o Laboratório de Processos Biotecnológicos II da Universidade Federal do Paraná. O material foi seco em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 45°C durante 72 horas. Após a secagem realizou-se a moagem em moinho de facas e a separação por granulometria em conjunto de peneiras, originando três frações:

- Fração fina com granulometria menor que 0,8 mm,
- Fração média com granulometria entre 0,8 e 2,0 mm,
- Fração grossa com granulometria maior que 2,0 mm.

A granulometria escolhida do pinheiro moído (PM) para ser utilizada nas fermentações foi a fina (menor que 0,8 mm).

4.2.2 Palma

Neste estudo foram utilizados os cachos vazios da palma (*Elaeis guineensis*), resíduos industriais obtidos na Biopalma, indústria extratora de óleo de palma localizada no município de Moju, no estado do Pará (figura 4).

Os resíduos foram trazidos para o Laboratório de Processos Biotecnológicos II da Universidade Federal do Paraná, secados em estufa de circulação de ar a 45°C durante 72 horas, moídos em moinho de facas e separados em três diferentes granulometrias:

- Fração fina com granulometria menor que 0,8 mm,
- Fração média com granulometria entre 0,8 e 2,0 mm,

- Fração grossa com granulometria maior que 2,0 mm.

A fração utilizada da palma moída (EFB) como indutora no processo foi a fração fina, e a utilizada no processo de biopolpação foi a fração média.



FIGURA 4 - CACHOS VAZIOS DA PALMA
FONTE: O AUTOR

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1 Lacase

A medição da atividade enzimática da enzima lacase foi realizada através do monitoramento da oxidação de 500 μ M de ABTS (2,2'-azino-bis- [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]) (SIGMA) no comprimento de onda de 420 nm.

Foram misturados 100 μ L da solução enzimática, 800 μ L de ABTS 100 μ M e 100 μ L de solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio (pH 4,0). Incubou-se em banho-maria na temperatura de 50°C durante 20 minutos. Após a incubação retirou-se 100 μ L da solução para realizar a leitura em microplaca (figura 5) no leitor de microplaca, Biotek Powerwave Xs, esta leitura mediu a oxidação do ABTS.

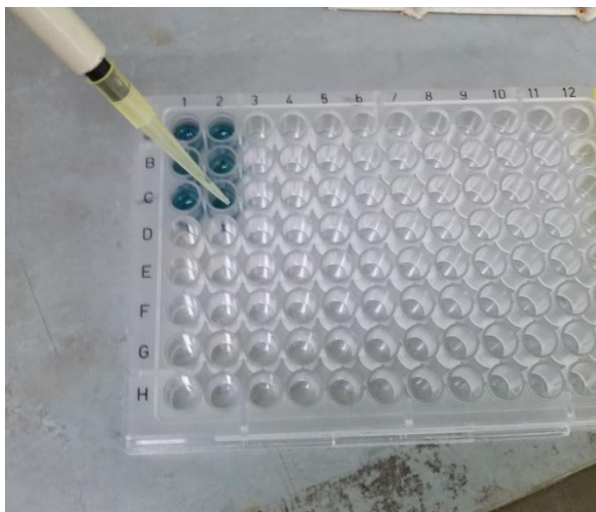


FIGURA 5- ANÁLISE ENZIMÁTICA DA LACASE EM MICROPLACA
FONTE: O AUTOR

Realizou-se a conversão de absorbância (abs) para atividade enzimática (U) segundo Niladevi et al.(2009), definindo uma unidade de atividade enzimática (U) como 1 μ M de ABTS oxidado por minuto. Para o cálculo da atividade enzimática considerou-se o coeficiente de absorção molar (ϵ) equivalente a $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, diâmetro de cada poço da microplaca de 6mm, e volume no poço de 100 μ L.

$$U/L = \frac{\Delta \text{Abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} = [U/L \text{ min}] \quad (1)$$

ΔAbs = Absorbância

ϵ = Coeficiente de absorção molar

R = Quantidade de solução da amostra

t = Tempo de reação (minutos)

U/L = Unidade de Atividade/Litro

4.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O meio de Kirk's otimizado (solução salina) utilizado em todo o processo era composto por: KH_2PO_4 (0,2 g/L), CaCl_2 (0,01 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/L), MnSO_4 (0,033 g/L), $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,035 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,043 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,08 g/L), NaMoO_4 (0,05 g/L), H_3BO_3 (0,01 g/L), KI (0,01 g/L).

As fermentações submersas realizadas com o fungo *Pleurotus* sp., cepa PL09, ocorreram em frascos Erlenmeyer de 250mL com 75mL de meio, realizadas em triplicata; todos os meios fermentativos foram compostos de quantidades variáveis de água destilada e meio de Kirk's otimizado. Foram adicionados como fonte de carbono a glicose e como fonte de nitrogênio o sulfato de amônio. O pH de todos os meios foi ajustado para o valor a ser testado. Todos os meios foram autoclavados na temperatura de 120°C por 15 minutos.

Após a autoclavagem, sob condições assépticas, foram adicionados oito discos do inóculo e os frascos foram acondicionados em shaker agitado por 7 dias, com temperatura controlada de 30°C e agitação de 120 rpm.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO MEIO

4.5.1 Teste base

A primeira fermentação foi realizada nas para servir como base inicial para os estudos e realizada nas seguintes condições:

Meio de Kirks: 10%

Água de diluição: 90%

Concentração de glicose: 10%

Concentração de sulfato de amônio: 1%

pH ajustado para 3,0

4.5.2 Planejamento fatorial para otimização da composição do meio de fermentação

Realizou-se um planejamento experimental $2^{(6-3)}$ com duplicata do ponto central para determinar as melhores concentrações de glicose, meio de Kirk's, sulfato de amônio, e valores de pH. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250mL com 75mL de meio.

Com base em estudos realizados anteriormente no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, escolheu-se o indutor "folhas e galhos de pinheiro moído" (PM) para estas fermentações.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÕES DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

AMOSTRA	GLICOSE (g/L)	KIRK'S (%)	SULFATO DE AMÔNIO (g/L)	PM (g/L)	pH
1	5	5	0,5	15	5,0
2	15	5	0,5	5	3,0
3	5	15	0,5	5	5,0
4	15	15	0,5	15	3,0
5	5	5	1,5	15	3,0
6	15	5	1,5	5	5,0
7	5	15	1,5	5	3,0
8	15	15	1,5	15	5,0
9	10	10	1,0	10	4,0
10	10	10	1,0	10	4,0

As concentrações dos componentes variaram de 5 a 15 g/L para glicose, 5 a 15% para meio de Kirk's, 0,5 a 1,5 g/L para sulfato de amônio, 5 a 15g/L para PM e 3,0 a 5,0 para o pH, como demonstrado na tabela 2. Neste planejamento a atividade enzimática foi realizada no 7º e 14º dias de fermentação.

Todos os meios foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C e posteriormente inoculados sob condições assépticas. A quantidade do inóculo, as condições de temperatura e agitação foram mantidas as mesmas em todas as fermentações.

4.6 ESCOLHA DOS INDUTORES

Com relação aos indutores testaram-se quatro alternativas: as folhas e galhos de pinheiro moído (PM), ácido ferúlico, sulfato de cobre (CuSO_4) e os cachos vazios da palma moídos (EFB). Os testes foram feitos utilizando um planejamento experimental rotacional com 4 fatores e 3 pontos centrais.

Os experimentos ocorreram em frascos Erlenmeyer de 250mL com 75mL de meio. Os meios foram compostos por 10g/L de glicose, 1,0 g/L de sulfato de amônio e 10% de meio de Kirk's. O pH de todos os meios foi ajustado para 4,0 e as concentrações utilizadas dos indutores estão descritas na tabela 3.

Todos os meios foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C e posteriormente inoculados utilizando 8 discos de inóculo (sob condições assépticas).

O ácido ferúlico foi o único indutor que não foi adicionado no início da fermentação, sendo adicionado apenas no quarto dia de fermentação. Isto ocorre porque se for adicionado no começo ele inibe o crescimento do fungo.

Os meios foram mantidos em shaker agitado com temperatura controlada de 30°C e agitação de 120 rpm durante sete dias.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DOS INDUTORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO ROTACIONAL FATORIAL

AMOSTRA	PM (g/L)	EFB (g/L)	COBRE (g/L)	ÁC. FERÚLICO (g/L)
PR1	3	3	0,1	0,5
PR2	3	3	0,05	0,5
PR3	3	1	0,1	1
PR4	1	3	0,05	1
PR5	3	1	0,05	1
PR6	1	1	0,1	0,5
PR7	1	3	0,1	1
PR8	1	1	0,05	0,5
PR9	0,32	2	0,075	0,75
PR10	3,68	2	0,075	0,75
PR11	2	0,32	0,075	0,75
PR12	2	3,68	0,075	0,75
PR13	2	2	0,033	0,75
PR14	2	2	0,12	0,75
PR15	2	2	0,075	0,33
PR16	2	2	0,075	1,17
PR17	2	2	0,075	0,75
PR18	2	2	0,075	0,75
PR19	2	2	0,075	0,75

4.7 CINÉTICA

O estudo cinético foi realizado para relacionar a atividade enzimática e o tempo de fermentação. Foram feitas medições da atividade de lacase a cada 24 horas de fermentação pelo período de 9 dias. O experimento foi realizado em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de meio. O meio foi composto por 10g/l de glicose, 1g/L de sulfato de amônio, 10g/L do indutor

EFB e 10% de meio de Kirk's. O pH foi ajustado para 4,0, e o volume do meio completado com água destilada.

Nesta cinética, além do valor de atividade enzimática de lacase, foi também avaliado o consumo de glicose. A amostra foi previamente centrifugada em centrífuga de bancada Jouan (A14) e o sobrenadante foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), equipado com coluna Aminex HPX-87-H, instalada em forno mantido a 60°C quando em operação, com fase móvel solução 5 mM de H₂SO₄ na vazão de 6,0 mL/min e detector de índice de refração (IR).

4.8 PRÉ PURIFICAÇÃO/CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Na etapa de pré-purificação realizaram-se diversas filtrações convencionais para purificar o extrato enzimático e também utilizou-se uma membrana de 100kDa para concentrar a enzima, aumentando a atividade unitária. Todos os processamentos realizados estão relacionadas na tabela 4.

TABELA 4 - AMOSTRAS DO PROCESSO DE PRÉ-PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE E SEUS TIPOS DE PROCESSAMENTO

AMOSTRA	TIPO DE PROCESSAMENTO
I	Fermentado bruto, sem centrifugação
II	Após centrifugação 5000 rpm por 15 minutos
III	Após filtragem a vácuo membrana comum
III1	Após filtragem a vácuo membrana 80 mm
III2	Após filtragem a vácuo membrana 0,47mm
V'	Retido na membrana 100 kDa
V,	Filtrado da membrana 100 kDa

Para estes testes realizou-se uma fermentação com um volume maior de meio, com 1L de meio e mantendo as demais condições como otimizado nos estudos anteriores. A fermentação foi realizada com concentrações de glicose

de 10g/L, 1g/L de sulfato de amônio, 10g/L do indutor EFB e 10% de meio de Kirk's. O pH foi ajustado para 4,0, e o volume do meio completado com água destilada. Este meio foi autoclavado durante 20 minutos com temperatura controlada de 120°C e posteriormente inoculado sob condições assépticas com a quantidade de inóculo adequada ao aumento do meio.

Após sete dias de fermentação, o fermentado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Himac CR21E) a 5.000rpm, temperatura de 23°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana comum no filtro a vácuo. Após esta primeira filtração realizou-se uma nova filtração, também em filtro a vácuo, mas com uma membrana de porosidade menor (80nm). Novamente foi realizada outra filtração a vácuo, com membrana de 47nm.

Após todas estas filtrações em filtro a vácuo realizou-se uma ultrafiltração utilizando filtros Amicon Ultra de 100kDa (figura 6). No filtro foi adicionada a quantidade de amostra conforme indicado pelo fornecedor (12mL) e a mesma foi centrifugada em centrífuga de bancada Excelsa II (206 BL) durante 30 minutos com rotação de 3900 rpm. O retido na membrana foi re-suspendido com 10mL de tampão citrato de sódio-ácido cítrico pH 4,0.

Em todos os filtrados obtidos nestas etapas do processo fez-se a quantificação enzimática da enzima lacase.



FIGURA 6 - FILTRO AMICON ULTRA DE 100kDa
FONTE: O AUTOR

4.9 POLPAÇÃO ENZIMÁTICA

Para a polpação enzimática, realizada em triplicata, acondicionou-se em frascos Erlenmeyer de 125 mL 0,5g de EFB e 15 mL de solução. Esta solução foi composta por 1mL de extrato enzimático (atividade de 100,22 U/mL) e 14mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico pH 4,0. Os Erlenmeyers permaneceram em shaker agitado com agitação de 120rpm e temperatura controlada de 30°C, as amostras foram retiradas a cada dois dias e filtradas em papel filtro comum a vácuo. A fibra que permaneceu no retido do papel filtro foi seca em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 80°C durante 48horas. O filtrado foi armazenado em geladeira comum para posterior análise.

4.9.1 Análise do substrato lignocelulósico

Para avaliar as mudanças da fibra durante todo o processo de polpação enzimática fez-se a análise da composição das fibras com a quantificação de lignina, celulose e hemicelulose. Para estas análises utilizou-se como base o protocolo definido pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL), por SLUITER et al. (2011).

Foram misturados 0,3 g da fibra seca com 3,0 mL de ácido sulfúrico 72%, permanecendo em banho-maria a 30°C durante 60minutos (agitou-se com bastão de vidro a solução a cada 15 minutos). Após o banho-maria adicionou-se 84 mL de água destilada e as amostras foram colocadas em autoclave durante 60 minutos à temperatura de 120°C. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e filtradas em membrana comum no filtro a vácuo.

A amostra retida no papel filtro foi seca em papel filtro (previamente pesado) em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 100°C durante 24 horas. Pesou-se o papel filtro e a biomassa seca foi pesada e colocada em cadinhos previamente pesados, estes colocados na mufla a 575°C durante 6 horas. Após isto pesou-se novamente os cadinhos para

determinar o teor de cinzas da amostra. Com o teor de cinzas fez-se o cálculo para determinar a lignina solúvel.

Para a dosagem da celulose e hemicelulose analisou-se o filtrado em HPLC equipado com coluna Aminex HPX-87-H, instalada em forno mantido a 60°C quando em operação, com fase móvel solução 5 mM de H₂SO₄ na vazão de 6,0 mL/min e detector de índice de refração (IR). Foram dosados os açúcares: glicose, xilose e arabinose.

Já para dosar a lignina solúvel, presente no filtrado, utilizou-se espectrofotômetro de UV visível com comprimento de onda de 280nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE BASE

Na primeira fermentação submersa realizada para a produção da enzima lacase as quantificações de atividades enzimáticas foram realizadas após 7 dias de fermentação. Como observado na tabela 5, os valores de atividade de lacase encontrados nas três amostras (experimento realizado em triplicata) para a fermentação submersa foram muito próximos, com uma média de atividade enzimática de 5,32 U/mL.

TABELA 5- ATIVIDADE DA LACASE PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO A CEPA PL09

AMOSTRA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)
3A'	5,10
3A''	5,97
3A'''	4,90

A literatura relata valores para a produção de lacase por *Pleurotus* sp.. Para *Pleurotus florida* Silva et al. (2012) encontraram atividade de 3,8U/mL e de 22,5U/mL para *Pleurotus ostreatus*, Menezes et al. (2009) encontraram valores de 3,52U/L e 1,63U/L utilizando *Pleurotus* sp. e *Pleurotus tailandia*, e Kamida et al. (2005) produziram 16UI/L com *Pleurotus sajor-caju*. Já Tychanowicz et al., (2004) encontraram valores mais altos de lacase utilizando *Pleurotus pulmonarius*, de 180U/mL.

Se compararmos os valores encontrados nas literaturas acima citadas com os valores encontrados nesta fermentação pode-se dizer que a atividade de 5,3245U/mL é satisfatória, tendo em vista que há uma grande variação de atividade enzimática conforme a espécie utilizada. Entretanto, o valor de atividade ainda é baixo para uso industrial, sendo necessário otimizar o processo para aumentar a atividade enzimática.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO MEIO

Com o intuito de aumentar a produção enzimática de lacase realizou-se a otimização do meio de fermentação através de um planejamento experimental $2^{(6-3)}$ com repetição no ponto central. As atividades enzimáticas encontradas, em todas as amostras do planejamento, para 7 e 14 dias de fermentação estão apresentadas na tabela 6, e as condições experimentais testadas estão mostradas na tabela 2.

TABELA 6 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA LACASE, EM U/mL PARA 7 E 14 DIAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

AMOSTRA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)	
	7 DIAS	14 DIAS
1	66,44	74,90
2	54,96	74,56
3	85,10	95,84
4	3,15	3,89
5	3,66	3,75
6	90,87	91,77
7	55,47	115,97
8	77,78	110,49
9	82,01	113,65
10	81,55	111,74

Observando a média geral dos valores obtidos para as atividades enzimáticas neste planejamento experimental visualiza-se um aumento considerável em comparação à fermentação realizada inicialmente (teste base), sem o indutor PM.

Para 7 dias de fermentação o tratamento 6 foi o que apresentou o maior valor de atividade (90U/mL). O tratamento 3 e os 2 pontos centrais

(tratamentos 9 e 10) também apresentaram valores altos de atividade, muito próximos entre si; de 85,10 U/mL, 82,01 U/mL e 81,55 U/mL, respectivamente.

Em 14 dias de fermentação todas as amostras obtiveram seus valores de atividade enzimática aumentados. O tratamento 6, que possuiu a melhor atividade enzimática em 7 dias, não apresentou grande melhora na atividade no 14º dia de fermentação, aumentando apenas 0,98% sua atividade. Já as amostras dos pontos centrais apresentaram os melhores resultados para 14 dias, com média de atividade enzimática de 112,70 U/mL. Pode-se dizer que ocorreu um aumento considerável nesta atividade, já que a amostra 9 apresentou um aumento de 38,58% e a amostra 10 de 37,01%. Estes aumentos podem ser melhor visualizados na figura 7, a qual mostra as atividades enzimáticas de todos os tratamentos nos 7º e 14º dias de fermentação.

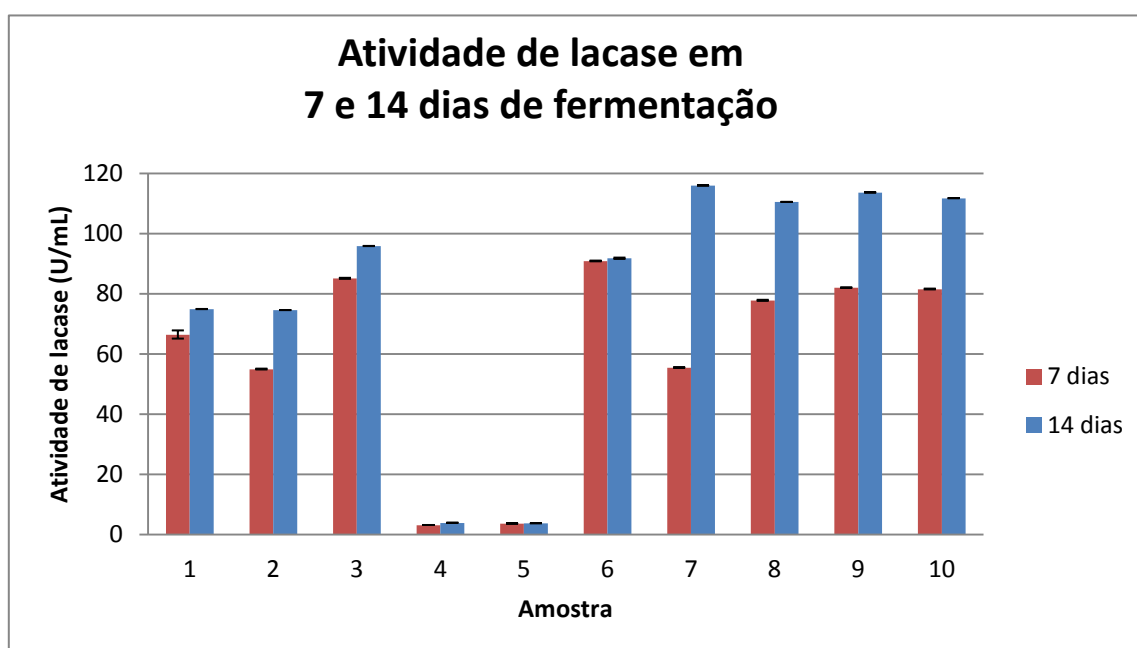


FIGURA 7 - ATIVIDADE DE LACASE NO 7º E 14º DIAS DE FERMENTAÇÃO PARA AS 10 AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL
FONTE: O AUTOR

Os tratamentos 4 e 5 foram os que apresentaram os piores resultados em ambas as análises, com valores de atividade menores do que os encontrados na primeira fermentação (sem o indutor).

Com base na análise das atividades enzimáticas decidiu-se então permanecer com as concentrações de glicose, Kirk's, sulfato de amônio, PM e pH determinados para os pontos centrais (10g/L para glicose, Kirk's e PM, 1,0g/L de sulfato de amônio e pH 4,0), já que estes apresentaram os melhores resultados na produção enzimática.

5.3 ESCOLHA DOS INDUTORES

Após a otimização do meio, com a definição das melhores concentrações de glicose, sulfato de amônio, meio de Kirk's e valores de pH, foram realizados os experimentos para a avaliação de possíveis indutores que incrementassem a atividade de lacase no extrato enzimático.

Ocorreu uma grande variação na atividade enzimática neste estudo. Os dados das atividades enzimáticas para melhor comparação entre os tratamentos estão mostrados na figura 8.

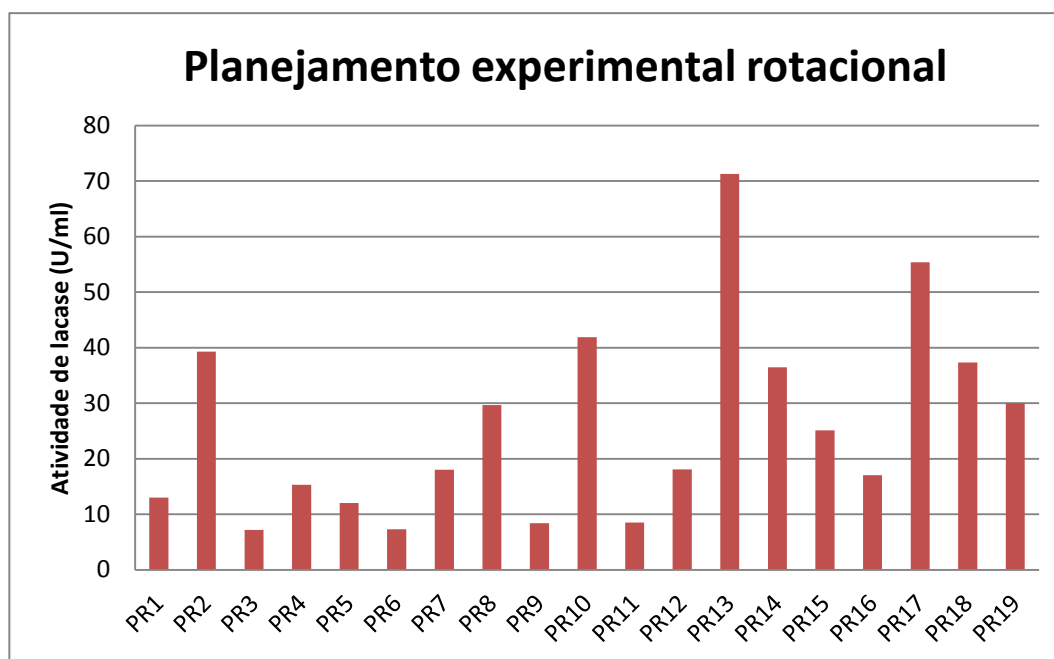


FIGURA 8 - GRÁFICO RELACIONANDO A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE NAS DIFERENTES AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ROTACIONAL
FONTE: O AUTOR

Na tabela 7 são apresentados todos os valores das atividades enzimáticas encontrados para as amostras do planejamento, e suas respectivas concentrações utilizadas dos possíveis indutores conforme a tabela 3. O menor valor encontrado para a atividade de lacase foi de 7,27 U/mL na amostra PR6 e o maior valor obtido foi para a amostra PR13, com 71,30 U/mL. As demais amostras apresentaram valores bem distintos, variando de 8,38U/ml a 55,38 U/mL.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DOS INDUTORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO ROTACIONAL FATORIAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

AMOSTRA	PM (g/L)	EFB (g/L)	CUSO ₄ (g/L)	ÁCIDO FERÚLICO (g/L)	ATIVIDADE DE LACASE (U/mL)
PR1	3,0	3,0	0,1	0,5	13,01
PR2	3,0	3,0	0,05	0,5	39,26
PR3	3,0	1,0	0,1	1,0	7,77
PR4	1,0	3,0	0,05	1,0	15,33
PR5	3,0	1,0	0,05	1,0	12,05
PR6	1,0	1,0	0,1	0,5	7,27
PR7	1,0	3,0	0,1	1,0	18,01
PR8	1,0	1,0	0,05	0,5	29,68
PR9	0,32	2,0	0,075	0,75	8,38
PR10	3,68	2,0	0,075	0,75	41,86
PR11	2,0	0,32	0,075	0,75	8,52
PR12	2,0	3,68	0,075	0,75	18,06
PR13	2,0	2,0	0,033	0,75	71,30
PR14	2,0	2,0	0,12	0,75	36,44
PR15	2,0	2,0	0,075	0,33	25,10
PR16	2,0	2,0	0,075	1,17	17,04
PR17	2,0	2,0	0,075	0,75	55,38
PR18	2,0	2,0	0,075	0,75	37,32
PR19	2,0	2,0	0,075	0,75	30,00

Analisando o gráfico de superfície de resposta representado pela figura 9, ocorre um aumento da atividade enzimática em função das variáveis experimentais testadas, ácido ferúlico e PM; podendo observar que este aumento na atividade enzimática acontece para ambos os indutores. O indutor PM apresentou efeito positivo quando utilizadas concentrações mais elevadas e o ácido ferúlico com concentrações intermediárias.

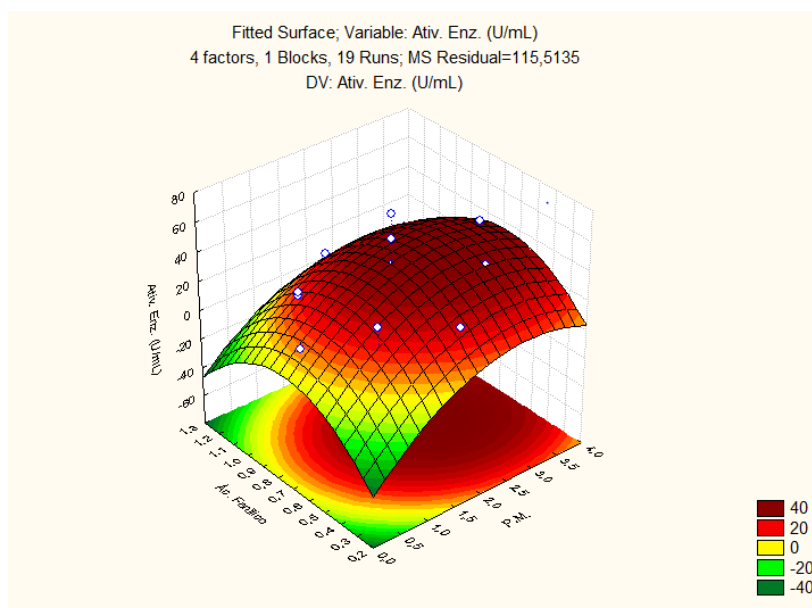


FIGURA 9 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PM E ÁCIDO FERÚLICO COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE
FONTE: O AUTOR

No segundo gráfico de superfície de resposta, figura 10, que relaciona a atividade enzimática com os indutores PM e EFB, visualiza-se também um aumento da atividade na presença dos indutores, também demonstrando sua eficiência neste processo. Ambos os indutores se comportaram de maneira similar neste gráfico de superfície de resposta.

Já quando são comparados os indutores cobre e EFB, o comportamento do gráfico muda, figura 11. O cobre como possível indutor se comportou de maneira negativa nas concentrações testadas, já que não apresentou aumento na atividade enzimática com relação ao seu uso, sendo descartada sua possibilidade de utilização como possível indutor no processo.

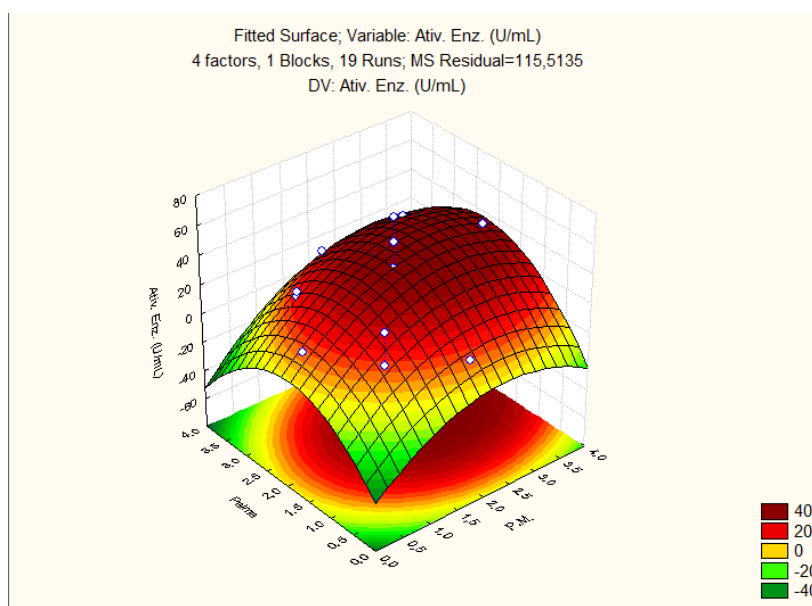


FIGURA 10 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PM E PALMA COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE
FONTE: O AUTOR

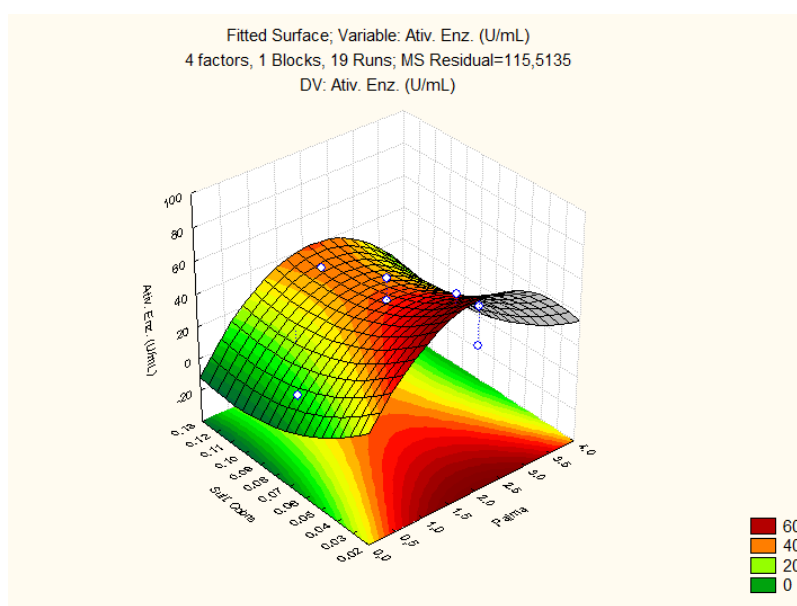


FIGURA 11 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PALMA E COBRE COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE
FONTE: O AUTOR

Já quando se relacionam os indutores ácido ferúlico e palma com a atividade enzimática, figura 12, observa-se que há um aumento na resposta, em relação ao PM ou o cobre. O aumento na concentração enzimática ocorre

para valores baixos e intermediários de ambos os indutores, o que é ótimo para o processo já que não seriam necessárias grandes concentrações destes indutores, reduzindo custos no processo.

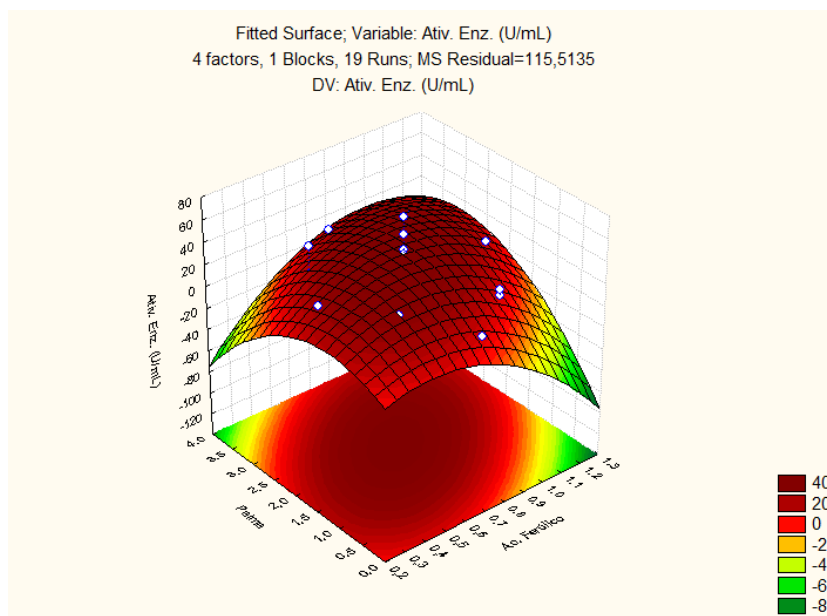


FIGURA 12 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO OS INDUTORES PALMA E ÁCIDO FERÚLICO COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE
FONTE: O AUTOR

Verificou-se então que os indutores que apresentaram efeito significativo para este processo são o ácido ferúlico e a palma. O gráfico de Pareto apresentado na figura 13, mostra o grau de significância destes indutores no processo.

Neste gráfico observa-se que a presença da palma moída (EFB) é a variável de efeito mais significativo para este processo, com significância maior do que o ácido ferúlico. Já o cobre e o PM apresentaram influência menor na variável resposta (ao nível de significância de 95%), o que realmente confirmou que não seriam os indutores mais importantes para este processo.

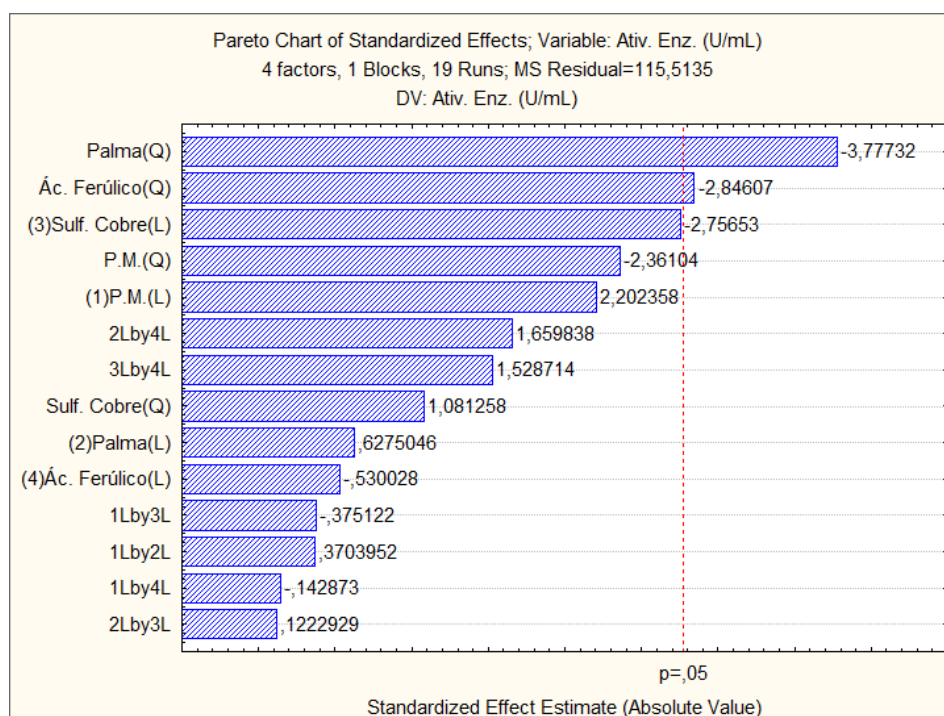


FIGURA 13 - GRÁFICO DE PARETO COM AS VARIÁVEIS PALMA, ÁCIDO FERÚLICO, SULFATO DE COBRE E PM
FONTE: O AUTOR

Com base no planejamento experimental realizado e todas as comparações dos diferentes indutores testados e suas significâncias para o processo, decidiu-se que o melhor indutor para aumentar a atividade da enzima lacase é a palma moída (EFB). Definindo assim que a palma permanecerá como indutor nas próximas etapas do estudo.

5.4 CINÉTICA

Para acompanhar como é o comportamento do aumento da atividade da lacase durante todo o processo de fermentação realizou-se uma cinética de produção enzimática, avaliando-se a cada 24 horas a atividade de lacase. Foi possível assim, determinar o pico de atividade da enzima e também como ocorre o consumo de açúcar durante toda a fermentação. Todos os valores obtidos nos 9 dias de fermentação estão apresentados na tabela 8.

TABELA 8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONSUMO DE GLICOSE DURANTE 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO

DIAS	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)	CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (g/L)
1	5,81	9,89
2	34,49	10,49
3	31,60	7,58
4	66,72	8,61
5	98,31	9,06
6	102,53	8,57
7	110,01	7,61
8	111,70	7,30
9	102,44	7,47

Para a atividade enzimática, verifica-se que ocorre um aumento significativo do primeiro para o segundo dia de fermentação (de 5,81 U/mL para 34,49 U/mL), mantendo-se em elevação até o oitavo dia de fermentação (111,70 U/mL). No nono dia de fermentação ocorre uma queda da atividade, justificando finalizar a fermentação, já que o interesse nesta etapa do processo é encontrar o pico de atividade.

Do sétimo para o oitavo dia de fermentação o aumento de atividade não é significativo, definindo-se sete dias o tempo ideal para o processo fermentativo, obtendo assim uma atividade alta e um tempo não muito longo para que ocorra o processo.

Com relação ao consumo de glicose, observa-se que o microrganismo não a utiliza muito para se desenvolver e produzir a lacase, figura 14; permanecendo com valor de 7,47g/L no final do processo. Isto é uma vantagem para a produção enzimática já que diminui os custos de reagentes. Sendo assim sugere-se que nos próximos estudos seja feita uma otimização desta concentração de açúcar para definir um menor e melhor valor a ser utilizado.

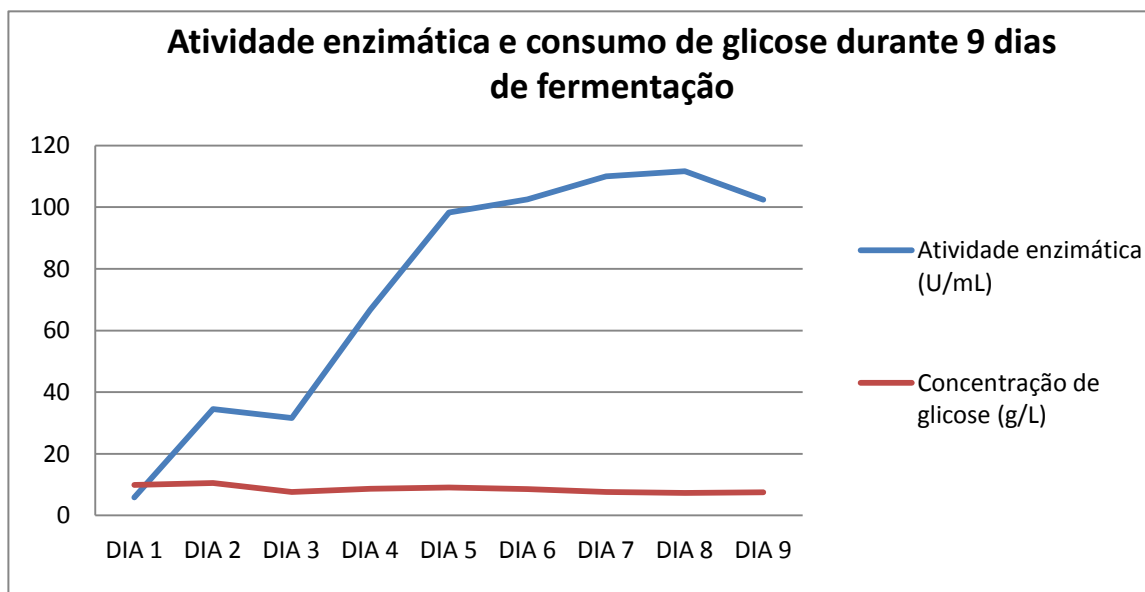


FIGURA 14 - GRÁFICO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONSUMO DE GLICOSE DURANTE 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO
 FONTE: O AUTOR

5.5 PRÉ PURIFICAÇÃO

A etapa de pré-purificação foi realizada para determinar a faixa de peso molecular da enzima de interesse a ser recuperada. Realizaram-se diversas filtrações sequenciais para purificar e concentrar a enzima. Utilizou-se uma membrana de 100kDa para determinar a faixa de peso molecular da enzima, concluindo-se que esta possui tamanho maior que 100kDa, já que sua maior concentração permaneceu no retido da membrana.

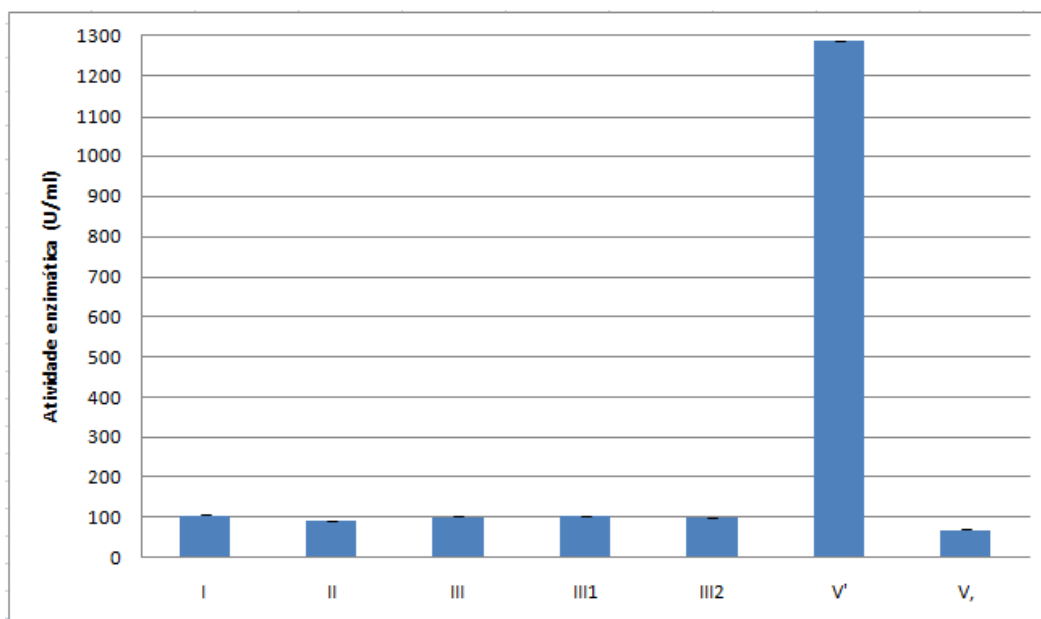


FIGURA 15 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE NAS DIFERENTES AMOSTRAS DA PRÉ-PURIFICAÇÃO
 FONTE: O AUTOR

Na tabela 9 estão relacionadas todas as amostras e os tipos de filtrados obtidos nesta etapa com as respectivas atividades enzimáticas. A atividade inicial do fermentado bruto foi de 106,26 U/mL e conseguiu-se concentrar utilizando a membrana de 100kDa, chegando-se ao valor de 1286,35 U/mL. Estes valores estão mostrados no gráfico da figura 15, e na tabela 9.

TABELA 9 - RELAÇÃO DOS DIFERENTES FILTRADOS E SUAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

AMOSTRA	TIPO DE PROCESSAMENTO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)
I	Fermentado bruto, sem centrifugação	106,26
II	Após centrifugação 5000rpm	92,83
III	Após filtragem a vácuo membrana comum	102,13
III1	Após filtragem a vácuo membrana 80mm	103,72
III2	Após filtragem a vácuo membrana 0,47mm	99,59
V'	Retido na membrana 100kDa	1286,35
V,	Centrifugado na membrana 100kDa	70,55

5.6 POLPAÇÃO ENZIMÁTICA

Com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores do estudo, realizou-se a aplicação da enzima lacase produzida e otimizada no resíduo da palma moído (EFB) para avaliar o processo de Polpação Enzimática. Na tabela 10 estão apresentados os valores de lignina, celulose e hemicelulose presentes nas fibras analisadas em todas as amostras.

TABELA 10 - TEOR DE LIGNINA, CELULOSE E HEMICELULOSE DURANTE A POLPAÇÃO ENZIMÁTICA

AMOSTRA	TEMPO (d)	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)
Pol/0	0	35,46	20,35	27,16
Pol/2	2	43,50	22,92	21,62
Pol/4	4	45,12	25,68	16,08
Pol/6	6	46,13	25,14	15,69
Pol/8	8	46,29	24,98	13,78

Pode-se observar na tabela 10 que o teor de lignina presente na fibra diminui com a polpação enzimática. O valor de lignina na fibra bruta antes do processo de polpação enzimática era de 27,16%, e após 8 dias de polpação apresentou valor de 13,78%, mostrando assim que o extrato enzimático aplicado na fibra foi efetivo, degradando parte da lignina.

Outro dado interessante observado nesta mesma tabela é o valor de celulose presente na fibra. A celulose foi preservada durante os 8 dias, o que é importante para o processo de polpação, já que seu uso é de grande interesse econômico.

6. CONCLUSÃO

Com os estudos de otimização da produção da enzima lacase conseguiu-se determinar as melhores concentrações dos reagentes para compor o meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio e pH) para a cepa PL09, para se obter uma boa atividade enzimática no caldo fermentado.

Esta produção enzimática foi melhorada com a escolha do indutor. Definiu-se que os resíduos da Palma (cachos vazios moídos - EFB), podem ser utilizados como indutor neste processo e podem ser considerados eficientes indutores para aumentar a atividade de lacase. Além de induzir a melhor atividade enzimática (110,01 U/mL) entre os indutores testados seu uso é vantajoso economicamente por ser um resíduo, aumentando também o valor agregado do produto inicial (óleo da palma).

Concluiu-se que o melhor tempo para o processo de produção de lacase com o indutor EFB neste estudo foi de 7 dias, um tempo relativamente curto para produção de enzimas.

O extrato otimizado produzido pelo fungo *Pleurotus sp* contendo a enzima lacase pode ser utilizado efetivamente no processo de polpação enzimática de resíduos lignocelulósicos, reduzindo os teores de lignina do material e preservando a celulose.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a produção de extratos enzimáticos de outros gêneros de fungos da podridão branca ou parda.
- Obter e testar no processo de polpação enzimática extratos enzimáticos de outros tipos de fungos.
- Otimizar as condições físico-químicas do processo de polpação enzimática, testando pHs, temperaturas e outras relações enzima/substrato.
- Avaliar as qualidades da fibra obtida no processo de polpação enzimática para uso como polpa de celulose, comparando com outros processos de polpação.
- Avaliar o aumento da digestibilidade da fibra de celulose obtida no processo de polpação enzimática, comparando com outros processos de polpação.
- Fazer estudos de purificação dos extratos enzimáticos produzidos, utilizando FPLC.

REFERÊNCIAS

- ALESSIO, P.; CAVALHERI, A. S.; PASQUINI, D.; CURVELO, A. A. S.; CONSTANTINO, C. J. L. FABRICAÇÃO DE FILMES ULTRAFINOS DE LIGNINA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR VIA EVAPORAÇÃO TÉRMICA A VÁCUO. **Rev. Bras. de Aplicações de Vácuo**, v. 27, n. 4, p. 169–174, 2008.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G. DE; SOUZA, C. G. M. DE; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364–368, 2007.
- ALVES, A. L. Produção , purificação e caracterização de uma lacase de *Phlebia rufa* (Pers.) M. P. Christ. **Dissertação (Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real**, 2011.
- BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 248–252, 2007.
- BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em diferentes substratos pasteurizados. **Arq. Ins. Biol.**, v. 78, p. 217–223, 2011.
- BRACELPA. Dados do Setor. **Associação Brasileira de Celulose e Papel**, 2014.
- CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 1, p. 23–31, 2007.
- CAMPOS, C. S.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazonia. **Interciencia**, v. 35, n. 3, p. 198–201, 2010.
- CARVALHO, A. M. DE; DANTAS, R. D. A.; COELHO, M. C.; et al. Teores de Hemicelulose, Celulose e Lignina em Plantas de Cobertura com Potencial para Sistema Plantio Direto no Cerrado. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2010.
- CORAL MEDINA, J. D.; WOICIECHOWSKI, A.; ZANDONA FILHO, A.; et al. Lignin preparation from oil palm empty fruit bunches by sequential acid/alkaline treatment – A biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 172–178, 2015.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 37–42, 2009.

FAN, X.; ZHOU, Y.; XIAO, Y.; XU, Z.; BIAN, Y. B. Cloning, expression and phylogenetic analysis of a divergent laccase multigene family in *Auricularia auricula-judae*. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 453–462, 2014. Elsevier GmbH.

FARIA, R. A. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora*. **Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2010.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013. Elsevier Inc.

FERRAZ, A. Biopulping developments in Brazil. **O Papel**, v. 68, p. 44–53, 2007.
FIGUEIRÓ, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 924–930, 2011.

FONSECA, M. I.; FARIÑA, J. I.; CASTRILLO, M. L.; et al. Biopulping of wood chips with *Phlebia brevispora* BAFC 633 reduces lignin content and improves pulp quality. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 29–35, 2014. Elsevier Ltd.

FONT, X.; CAMINAL, G.; GABARRELL, X.; ROMERO, S.; VICENT, M. T. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 5, p. 548–554, 2003.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 529–536, 2002.

GARCIA, T. A. Purificação e Caracterização das Lacases de *Pycnoporus sanguineus*. **Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília**, 2006.

GIL, E. S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M. F.; GARCIA, T. A. Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 27, n. 3, p. 215–225, 2009.

GÓMEZ, J.; PAZOS, M.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Corioliopsis rigida* under solid-state conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 315–319, 2005.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 12–18, 2003.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 72, n. 5, p. 857–868, 2015.

HYEON, J. E.; YOU, S. K.; KANG, D. H.; et al. Enzymatic degradation of lignocellulosic biomass by continuous process using laccase and cellulases with the aid of scaffoldin for ethanol production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1266–1273, 2014. Elsevier Ltd.

IYER, G.; CHATTOO, B. . Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 1, p. 121–126, 2003.

KALRA, K.; CHAUHAN, R.; SHAVEZ, M.; SACHDEVA, S. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. and effect of PH and temperature on its activity. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 5, p. 2229–2235, 2013.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. DE. Biodegradation of textile effluents by *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629–632, 2005.

KARP, S. G.; FARACO, V.; AMORE, A.; et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735–739, 2012. Elsevier Ltd.

KIM, S.; PARK, J. M.; SEO, J.-W.; KIM, C. H. Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 229–233, 2012. Elsevier Ltd.

KOROLEVA, O. V.; GAVRILOVA, V. P.; STEPANOVA, E. V.; et al. Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated white-rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 573–580, 2002.

LENZ, J.; HÖLKER, U. Trickle-film Processing : An Alternative for Producing Fungal Enzymes. **BioForum Europe**, v. 6, p. 55–57, 2004.

LETTERA, V.; VECCHIO, C. DEL; PISCITELLI, A.; SANNIA, G. Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 11, p. 781–788, 2011. Academie des sciences.

LUKE, A. K.; BURTON, S. G. A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 6-7, p. 348–356, 2001.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; THANGAVELU, K. P.; HEESE, K. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 106–114, 2013. Elsevier B.V.

MARTÍN-SAMPEDRO, R.; EUGENIO, M. E.; VILLAR, J. C. Effect of steam explosion and enzymatic pre-treatments on pulping and bleaching of *Hesperaloe funifera*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 460–467, 2012.

MENDONÇA, R.; GUERRA, A.; FERRAZ, A. Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispora* for preparing high-yield kraft pulps. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 4, p. 411–418, 2002.

MENEZES, C.; SILVA, I.; DURRANT, L. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, n. 1, p. 68–78, 2009.

MERLIM, A. O. Macrofauna Edáfica Em Ecossistemas Preservados E Degradados De Araucária No Parque Estadual De Campos Do Jordão, SP. **Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2005.

MESSERSCHMIDT, A. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin modelling and structural relationships. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 341 –352, 1990.

MEZA, J. C.; AURIA, R.; LOMASCOLO, A.; SIGOILLOT, J.-C.; CASALOT, L. Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1-2, p. 162–168, 2007.

MEZA, J. C.; LOMASCOLO, A.; CASALOT, L.; SIGOILLOT, J. C.; AURIA, R. Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3365–3371, 2005.

MEZA, J. C.; SIGOILLOT, J.-C.; LOMASCOLO, A.; NAVARRO, D.; AURIA, R. New process for fungal delignification of sugar-cane bagasse and simultaneous production of laccase in a vapor phase bioreactor. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3852–3858, 2006.

NETO, S. L. M. Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica. **Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2012.

NILADEVI, K. N.; SUKUMARAN, R. K.; JACOB, N.; ANISHA, G. S.; PREMA, P. Optimization of laccase production from a novel strain-Streptomyces psammoticus using response surface methodology. **Microbiological Research**, v. 164, n. 1, p. 105–113, 2009.

NITHERANONT, T. N.; WATANABE, A. W.; ASADA, Y. A. Extracellular Laccase Produced by an Edible Basidiomycetous Mushroom, Grifola frondosa: Purification and Characterization. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 538–543, 2011.

PISCITELLI, A.; GIARDINA, P.; LETTERA, V.; et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current genomics**, v. 12, n. 2, p. 104–112, 2011.

PISCITELLI, A.; VECCHIO, C. DEL; FARACO, V.; et al. Fungal laccases: versatile tools for lignocellulose transformation. **Comptes rendus biologies**, v. 334, n. 11, p. 789–794, 2011.

RAMIRES, E. C. Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e glioxal reforçadas com fibras naturais. **Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, São Carlos, São Paulo**, 2010.

RAMPINELLI, J. R.; MARIA, R.; GERN, M.; et al. Valor nutricional de Pleurotus djamor cultivado em palha de bananeira. **Alim. Nutr**, v. 21, n. 2, p. 197–202, 2010.

RIBEIRO, R. C.; LEMOS, W. P.; BERNARDINO, A. S.; BUECKE, J.; MÜLLER, A. A. Primeira ocorrência de Alcaeorrhynchus grandis (Dallas)(Hemiptera: Pentatomidae) predando lagartas desfolhadoras do dendezeiro no Estado do Pará. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 1, p. 131–132, 2010.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; RODRÍGUEZ, A.; PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Laccase activity from the fungus Trametes hirsuta using an air-lift bioreactor. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 612–616, 2006.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500–513, 2006.

SILVA, J. J.; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; et al. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arq. Ciênc. Vet, Zool. Uipar**, v. 15, n. 2, p. 191–196, 2012.

SINGH ARORA, D.; KUMAR SHARMA, R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1760–1788, 2010.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. , 2011.

TAVARES, A. P. M. Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira. **Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal, 2006.**

TLECUITL-BERISTAIN, S.; SÁNCHEZ, C.; LOERA, O.; ROBSON, G. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. **Mycological research**, v. 112, n. 9, p. 1080–1084, 2008.

TYCHANOWICZ, G. K.; ZILLY, A.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 855–859, 2004.

VALLE, J. S. PRODUÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LACASES DE *Agaricus blazei* OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. **Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR, Curitiba, 2012.**

VISWANATH, B.; RAJESH, B.; JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; NARASIMHA, G. Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1–21, 2014.